Zur Methode der Spontanpapierfibrinolyse

Jörg Sipos

1967

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Zur Methode der Spontanpapierfibrinolyse

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der
gesamten Medizin
verfaßt
und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Jörg Sipos
aus Dresden

München 1967

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. N. Goossens

Mitberichterstatter: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern gewidmet

Herrn Professor Dr.N.Goossens danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und ganz besonders für die unermüdliche Unterstützung mit wertvollen Ratschlägen und Anregungen.

Inhaltsverzeichnis

A) Einleitung 2

Mechanismus der Fibrinolyse 2
Die spontane Fibrinolyse 4
Die therapeutische Fibrinolyse 5
Nachweismethoden 6

B) Experimenteller Teil 9

Verwendete Materialien und Geräte 9

Methode 10

I) Herstellung der Fibrinpapierfolie 11
II) Testansatz 13

1. Inkubation 15
2. Wässerung 17

III) Trocknen 17
IV) Auswertung 17

a) Färbung 17
b) photometrische Auswertung 18

Abweichungen bei der Durchführung der Methode ohne Einfluß auf die Reproduzierbarkeit 19

Bekannte Fehlerquellen 20

Fehlergrenze - Standardabweichung 22

Informative Versuche mit der neuen Arbeitsweise 24

1.-6.: Plasma ohne Zusätze 25
7.-9.: Plasma aktiviert mit Streptase 26
10.(a-f): Versuche zur 0% Lysewertbestimmung 27
11.(A,B): Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung 32

Praktisches Arbeiten mit der Spontanpapier-fibrinolyse 33

1. Urokinasebehandlung bei arteriellem Verschluß 33
2. Streptasebehandlung bei arteriellem Verschluß 35

Diskussion 37

Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse 40

Literaturangaben 41

Lebenslauf 45

Einleitung

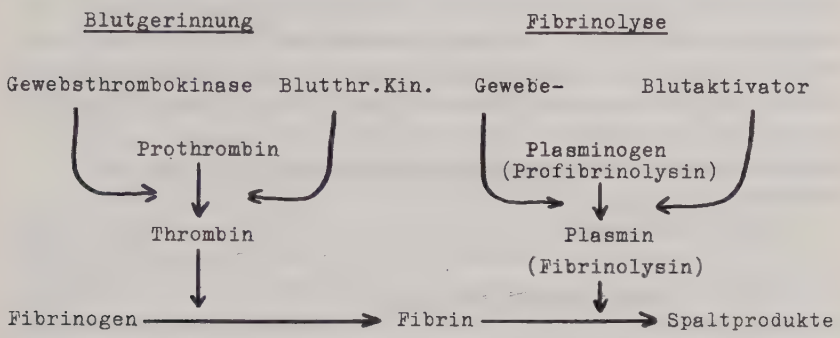
Die Fibrinolyse ist ein in den letzten Jahren eingehend erforschter enzymatischer Vorgang. Das Ferment ist im Blut selbst wirksam und dadurch einer therapeutischen Beeinflussung sehr gut zugängig.
Ihre Geschichte geht zurück bis Morgagni, der 1761 in seinem Werk = De sedibus et causis morborum = (21) das Flüssigbleiben des Leichenblutes bei plötzlichen Todesfällen beschrieb. Auch John Hunter hat 1835 auf die gleiche Tatsache hingewiesen (17).

Der Name Fibrinolyse stammt von Dastre, dem Nachfolger von Claude Bernard an der Sorbonne in Paris. Er erbrachte 1893 den Nachweis, daß Blut von Hunden nach einem Aderlaß eine fibrinolytische Aktivität aufweist (9).
Von größter Bedeutung war sodann die Beobachtung des amerikanischen Klinikers Tillet im Jahre 1935, daß Filtrate gewisser hämolytischer Streptokokken menschliche Plasmagerinnsel auflösen können (35).
Diese Entdeckung hatte weitreichende Konsequenzen: Der fibrinolytische Vorgang konnte jetzt jederzeit ausgelöst und in seinen Einzelheiten studiert werden. Dabei zeigte sich, daß die sogenannte Streptokinase nicht direkt das Fibringerinnsel auflöst, sondern ein vorbestehendes fibrinolytisches System aktiviert (19).

Mechanismus der Fibrinolyse

Die Fibrinolyse ist ein System, das die Aufgabe hat, bei der Blutstillung, Wundheilung und bei entzündlichen Prozessen abgelagertes Fibrin wieder abzubauen, wenn es seine Funktion erfüllt hat. Wahrscheinlich spielt die Fibrinolyse noch eine Rolle bei der sogenannten latenten Gerinnung im Gefäßsystem. Durch einen Regelkreis soll die Gerinnung ein bestimmtes Stadium nicht überschreiten können. Die Fibrinolyse stellt gewissermaßen ein Gegenstück zur Blutgerinnung dar. Die

Blutgerinnung erzeugt, die Fibrinolyse zerstört Fibrin.



-Abb. 1-

Der Reaktionsablauf ist trotz der gegensätzlichen Funktion der beiden Systeme sehr ähnlich (Abb.1). In beiden wird ein proteolytisches Ferment gebildet: Thrombin bzw. Plasmin. Das Thrombin trennt vom Fibrinogenmolekül das Fibrinopeptid, das Plasmin spaltet das Fibrin in kleinere Spaltstücke, die Polypeptide. Beide proteolytischen Fermente haben eine inaktive Vorstufe. Das Thrombin im Prothrombin, das Plasmin im Plasminogen. Sowohl bei der Blutgerinnung als auch bei der Fibrinolyse kann die inaktive Vorstufe auf zwei verschiedenen Wegen (2,3) aktiviert werden : Durch einen Gewebeaktivator oder durch einen bluteigenen Aktivator. Die Aktivatoren selbst haben auch eine inaktive Vorstufe, die Proaktivatoren (4). Ein physiologischer Vorgang von der Bedeutung der Fibrinolyse ist nicht denkbar ohne die Existenz einer Gegenregulation, d.h. ohne Inhibitoren. Die Inhibitoren sind gegen die hochaktiven Zwischen- und Endprodukte, nicht gegen deren Vorstufen im normalen Plasma gerichtet. Sie hemmen das Plasmin (Antiplasmine) bzw. den Aktivator (Antiaktivatoren). Neben diesen natürlichen Inhibitoren gibt es erworbene, wie die Antistreptokinase, die durch immunologische Vorgänge entstanden ist (29).

Plasmin (Fibrinolysin) ist nicht speziell auf Fibrin eingestellt. Es greift auch Fibrinogen und andere Gerinnungsfaktoren z.B. V, VIII an, und andere Eiweißkörper wie Casein, Gelatine, Lactoglobulin und die Hormone ACTH, STH. Trotzdem besteht eine gewisse Spezifität insofern, als die Vorstufe Plasminogen in selektiver Weise an das Fibrin adsorbiert wird. Dadurch kann das Plasmin (nach erfolgter Aktivierung) viel unmittelbarer auf das Fibrin einwirken als auf Eiweißkörper im Plasma (18;19).

Die spontane Fibrinolyse

Nach Fearnley ist eine gewisse fibrinolytische Aktivität schon im normalen Plasma nachzuweisen. Im Rahmen der latenten Blutgerinnung halten sich die Bildung und Auflösung von Fibrin die Waage, so daß das hämostatische Gleichgewicht erhalten bleiben kann.
Die normale Fibrinolyse wird aber durch zahlreiche Umstände gesteigert: Bei schweren körperlichen Anstrengungen (20), bei emotionellen Belastungen, durch Pyrogen-Einwirkung, bei Elektroschock (12) usw., also bei Stress-Zuständen. Eine Injektion von Adrenalin wirkt im gleichen Sinne.
Bei diesen Steigerungen der Fibrinolyse kommt es zu einer Auflösung von ausgefälltem Fibrin (das stets Profibrinolysin adsorbiert enthält). Offenbar genügt die Aktivierung des fibrinolytischen Systems nicht, um die Inhibitoren des Plasmas so weit zu neutralisieren, daß eine Blutungsgefahr entstehen könnte. Die Blutungsgefahr ist deshalb gering.
Die Fibrinolyse kann aber auch durch pathologische Bedingungen gesteigert werden. Dabei können lebensbedrohliche hämorrhagische Diathesen auftreten, die durch eine hochgradige Steigerung der Fibrinolyse und starke Abnahme des Fibrinogens und anderer Gerinnungsfaktoren im Plasma charakterisiert werden, z.B. beim Prostataca (34), bei gewissen geburtshilflichen Komplikationen (27) wie z.B. der vorzeitigen Lösung der Placenta (36).
Von französischen Autoren ist 1950 erstmals eine Spontan-Fibrinolyse bei Lungenresektionen beschrieben worden (31) (das Lungengewebe ist reich an Gewebsthrombokinase und an

fibrinolytischer Aktivität).
Auch bei der Lebercirrhose wird gelegentlich eine gesteigerte Fibrinolyse beobachtet (14). Eine Spontanfibrinolyse wurde außerdem beobachtet bei akuten Leukämien (29), bei Boeckschem Sarkoid (25), bei der Polycythaemia vera (7), beim Schock, Transfusionszwischenfällen und nach Hämorrhagien (33;19).

Die therapeutische Fibrinolyse

Beim Reinigen von Wunden, beim Hämothorax, beim Empyem, gelegentlich bei eitriger Meningitis werden Aktivatoren (Streptokinase, Streptodornase, Varidase) seit über 15 Jahren mit Erfolg angewandt.
Seit der weitgehenden Reinigung der Streptokinasepräparate ist die intravenöse Anwendung möglich geworden. Sie hat sich besonders bei thrombotischen Gefäßverschlüssen, sowohl des venösen als auch des arteriellen Systems für verschiedene Indikationen eingeführt (11,13,19,22).
Besonders gute Ergebnisse wurden beim akuten arteriellen Gefäßverschluß erreicht, der chirurgischen Maßnahmen nicht zugänglich ist. Ebenso bei ausgedehnten Venenthrombosen (Beckenvenenthrombosen, Phlegmasia caerulea dolens) und auch teilweise beim Herzinfarkt.
Der Erfolg einer solchen Therapie ist vor allem abhängig von dem Alter des Thrombus bzw. des Embolus. Nach 3-5 Tagen erschwert die einsetzende Organisation den Einfluß des Plasmins (5).
An Präparaten stehen die sogenannten direkten und die indirekten Fibrinolytika zur Verfügung.
Bisher haben sich nur drei direkt wirkende Stoffe bewährt: Von den Aktivatoren des fibrinolytischen Systems, die Streptokinase und die Urokinase, sowie das aktive Plasmin, bzw. Mischungen dieser Stoffe.
Streptokinase hat nach Deutsch (11) einen größeren therapeutischen Effekt als das Plasmin, das nach der Infusion ziemlich rasch durch Inhibitoren inaktiviert wird (6).
Die Streptokinase kann dagegen auch das im Gerinnsel enthaltene Plasminogen bzw. den Proaktivator aktivieren (10,11).
Allerdings bildet der Organismus Antikörper gegen die Strepto-

kinase. So muß vor jeder Streptokinase-Therapie der Antistreptokinase-Titer bestimmt werden, damit auch eine genügend hohe Streptokinase-Menge verabreicht wird.
In der Urokinase haben wir einen weiteren direkten Lyseaktivator. Gegen die Urokinase werden weniger Antikörper gebildet als gegen die Streptokinase. Die industrielle Herstellung ist aber schwierig und mit sehr hohen Kosten verbunden.
Die direkten Fibrinolytika lösen eine Fibrinolyse sowohl in vitro als auch in vivo aus, sofern aktivierbares Plasminogen vorhanden ist. Die indirekten Fibrinolytika zeigen in vitro keine Wirkung, verursachen aber in vivo eine Aktivierung des fibrinolytischen Systems. Zu diesen Substanzen gehören z.B. Lipopolysaccharide gewisser Bakterien (Pyrexal aus Salmonella equi), ferner Nicotinsäure, Adrenalin und Heparin.
Stark vermehrte Fibrinolyse birgt natürlich die Gefahr von schweren Blutungen in sich. Bei therapeutischer Anwendung ist deshalb eine dauernde Kontrolle des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems dringend erforderlich.
Die Ursache der Blutungen bei gesteigerter Fibrinolyse liegt im Defizit verschiedener Gerinnungsfaktoren, vor allem des Fibrinogens (1,4,7,26).
Deshalb besteht ein Interesse nicht nur aus wissenschaftlichen, sondern besonders aus praktisch therapeutischen Gründen für eine exakte, d.h. quantitative Fibrinolysebestimmungsmethode.

Nachweismethoden

Von den Fibrinolysebestimmungsmethoden seien nur die z.Zt. am häufigsten verwandten aufgeführt.

I) Fibrinplatten-Test nach T.Astrup.
Prinzip: Fibrinplatten enthalten Plasminogen, dieses zeigt sich, wenn nach Zusatz von Fibrinokinase Lyse auftritt.

II) Spontanlyse am unverdünnten oder verdünnten Blut oder Plasma, die nur grob quantitative Resultate bringt.

Die besten Ergebnisse erreicht man bei Verdünnung, weil

dadurch die Inhibitoren des fibrinolytischen Systems verringert werden. So kann es zu einem lytischen Effekt kommen ohne aktivierende Zusätze.

III) Euglobulinlysis-Test (Modifikation nach Kaulla)

Zitratblut 1:5 wird 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. 1 ml Plasma, verdünnt mit 15 ml Aqua dest wird 4 Minuten mit Kohlensäure beblasen. Durch den so erreichten pH von 5,2 - 5,3 werden die Euglobuline (sie enthalten sämtliche Gerinnungs- und Lysefaktoren) ausgefällt. Die Albumine bleiben in Lösung. Sie enthalten die stärkst wirksamen Antiplasmine. Durch erneutes Zentrifugieren erhält man das Sediment. Der Rest wird abgekippt. Das Sediment wird in 1 ml gepufferter NaCl-Lösung aufgelöst. Davon gibt man je 0,3 ml in Röhrchen und dazu 0,01 ml Thrombin. Es wird Fibrin gebildet. Nun wird die Zeit bis zur Auflösung gemessen.

IV) Thrombelastographie nach Hartert

Prinzip: In einer 0,15 ml fassenden Küvette wird Venenblut mit Paraffin überschichtet. In diese, um die Hochachse zum Pendeln gebrachte Küvette ragt ein torsionselastisch aufgehängter Stift. Die langsam entstehende Verbindung des Stiftes mit der Küvettenwand durch kohärente Fibrinmoleküle bringt eine Torsion des Stiftes zustande, die photokymographisch registriert wird.

Alle diese Methoden können im besten Falle als halb quantitative bezeichnet werden. Darin liegt unter anderem auch die Ursache, daß die sogenannten Standardwerte der verschiedenen Labors um mehr als 100 % voneinander abweichen. Die Ergebnisse verschiedener Institute oder Kliniken richtig zu vergleichen, ist infolgedessen äußerst schwierig.
Auf der Sucne nach einer Verbesserung der quantitativen Messung wurde von Goossens und Mitarbeitern die Papierfibrinolyse entwickelt.
Sie bestimmte die Fibrinolyse zunächst am mit Streptokinase aktivierten System. Im weiteren Verlauf zeichnete sich die

Möglichkeit ab, auch am nicht aktivierten System zu messen (Zantl).

Da die Aktivierung des Systems praktisch einer Art Streptokinaseresistenztest gleicht und jeder Fremdzusatz bei einer Methode weitere Probleme aufwirft, versuchten wir mit dieser Arbeit die Spontanpapierfibrinolyse weiter zu entwickeln und zu standardisieren.
Mit dieser Methode kann u.a. auch gerinnungsunfähiges Blut (etwa durch Zusatz von Heparin) auf seine fibrinolytische Aktivität untersucht werden.
Wir wollten besonders den Materialverbrauch und den Zeitaufwand herabsetzen und uns vor allem darum bemühen, die Ausführung der Methode so zu gestalten, daß sie mit den Mitteln eines Kliniklabors (Möglichkeit zur Bestimmung der Elektrophorese) ausgeführt werden kann.

Experimenteller Teil

Verwendete Materialien

1) Natriumzitrat 3,8 %ig, neutral - Klinikapotheke
2) Isoton.ster. NaCl-Lösung, 0,9 %ig pH 5,5 - 6
3) Veronalpuffer pH 7,3 (0.05 m) Klinikapotheke
4) Aqua bidestillata (Ampuwa)
5) Streptokinase zu diagnostischen Zwecken
6) Rinderfibrinogen (Behring) Amp. zu 60 mg
7) Test Thrombin (Behring) 60 NIH Einh./Amp.
8) eAcA (Roche) 5 ml mit 400 mg/ml
9) Chromatography Paper Whatman NoI gerichtet 28,5 x 3,9 cm
10) Amidoschwarz 10 B (Bayer)
11) Elphorentfärber 100 ml Eisessig + 900 ml Methanol
12) Elphor-Transparenzflüssigkeit

Geräte

1) Auswertegerät "Elphor-Integraph"
   und Vakuumpumpe (Bender & Hobein)
2) Bechergläser 250 ml weit
3) Objektträgerpinzetten
4) Hartgummirolle (Linolaufdruckwalze) 203,5 g schwer
5) Exsiccator mit $CaCl_2$
6) Brutschrank ($37^{o}C$)
7) Diarähmchen (Plastik) ausgefeilt auf die Größe 2,7 x 4,5 cm
8) flache Glasschälchen mit Durchmesser 5,2 cm
9) Feuchte Kammer
10) Lüftungsgitter

Methode

Die Papierfibrinolyse wurde von Goossens und Mitarbeitern (Müller (26)) inauguriert und von Scholle (28) modifiziert und standardisiert. Zantl (37) änderte die Papierfibrinolyse derart, daß er auf eine Aktivierung mit Streptase verzichtete und damit ohne Zusätze arbeitete. Er nannte diese Methode Spontanpapierfibrinolyse.

Prinzip:

Zitratblut (1:5) wird zentrifugiert (10 Min. bei 3500 rpm). Das Plasma wird abgehebert und mit Veronalpuffer (pH 7,3) verdünnt. Dieses verdünnte Plasma wird dann mit fibrinbeschichteten Elektrophoresepapierfolien auf seine fibrinolytische Aktivität untersucht. Das Fibrin wird aus dem Papier gelöst, je nach Stärke der Aktivität.
Mit Amidoschwarz 10 B wird die so behandelte Folie angefärbt, nachdem sie gewässert und getrocknet wurde. Eine anschließende photometrische Auswertung ermöglicht quantitative Aussagen über das gelöste Fibrin.

Im einzelnen sind folgende Arbeitsgänge notwendig:

I. Herstellung der Fibrinpapierfolie
II. Testansatz
    1.) Inkubation
    2.) Wässerung
        a) im fließenden Leitungswasser (15 Min.)
        b) in isotonischer Kochsalzlösung (20-22 Std.)
III. Trocknen
IV. Auswertung
    a) Färbung
    b) photometrische Auswertung

Die Aufgabe unserer Arbeit war es, die Spontanpapierfibrinolyse zu standardisieren und wenn möglich, zu verbessern.

I. Herstellung der Fibrinpapierfolie

Prinzip: Elphorpapierstreifen werden zuerst mit Fibrinogenlösung getränkt, dann luftgetrocknet, mit Thrombinlösung getränkt, erneut luftgetrocknet und anschließend bis zur Verwendung im Testansatz im Exsiccator aufbewahrt. Für die Versuche werden die sogenannten Fibrinpapierfolien verwendet. Ein Streifen kann in 6 Folien zerschnitten werden. Die Folie hat eine Breite von 3 cm.

Fibrinogenlösung: Benötigt wird eine 0.3%ige Fibrinogenlösung. 1 Röhrchen Rinderfibrinogen (Behring) enthält 60 mg. Für eine 0.3%ige Lösung werden also 5 Röhrchen benötigt. Das Fibrinogen wird in 100 ml isotonischer Kochsalzlösung aufgelöst. Da die Auflösung ziemlich langsam (1-1 1/2 Std.) erfolgt, empfiehlt es sich, die Lösung schon etwas vorher anzusetzen.
Die Lösung soll gefiltert werden, um Paraffinbröckel vom Stopfen des Präparateglases und geringe, nicht gelöste Fibrinogenreste aufzufangen.
Mit diesen 10 ml Lösung können ca. 20-30 Streifen getränkt werden.

Tränkung der Papierstreifen mit der Fibrinogenlösung:

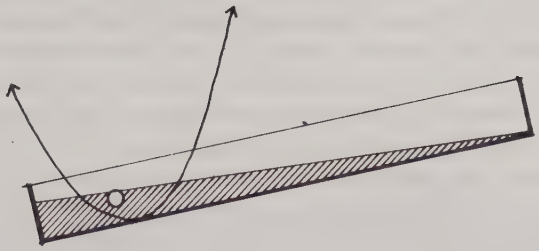
Diesem Vorgang, überhaupt der ganzen Herstellung der Fibrinpapiere, muß größte Sorgfalt zuteil werden.
Von der Einheitlichkeit der Fibrinschicht hängt ein sehr großer Teil der Genauigkeit dieser Methode ab.
Die Fibrinlösung befindet sich in einem schmalen Glasgefäß, das gerade so weit ist, daß der Streifen (3,9 cm breit) leicht durch die Lösung gezogen werden kann. Aber auch bei den letzten Streifen (nur noch wenig Flüssigkeit vorhanden!) sollte eine ausreichende Eintauchtiefe möglich sein.
Die Streifen werden mit Objektträgerpinzetten gehalten und einmal zügig hin und her durchgezogen.

Ausrollung der überstehenden Flüssigkeit:

Nach dem Durchziehen durch die Lösung werden die Papierstreifen auf eine Glasscheibe gelegt. Bei einer Neigung der Scheibe von ca. 35° wird die reichlich überstehende Flüssigkeit mit einer Hartgummirolle (ca. 200 g) durch einmaliges Überrollen von oben nach unten beseitigt.
Das Überrollen erfolgt langsam und ohne zusätzlichen Druck, so daß die Präparation weitgehend gleichmässig und schonend für das Papier verläuft. Scheibe und Rolle werden nach jedem Ausrollen trockengewischt.
Nach dem Ausrollen werden die Streifen horizontal über die Ränder eines großen leeren Wasserbades straff aufgespannt. Die Flüssigkeit darf sich nicht an einer durchhängenden Stelle sammeln.
Nach einer Zwischentrocknung bei Zimmertemperatur (ca. 2 Std.) werden die Streifen mit Thrombin getränkt.

Thrombintränkung

1 Ampulle Test Thrombin (Behring) enthält 60 NIH E. Da 10 E mit 1 ml Aqua bidest (Ampuwa) gelöst werden sollen, benötigt man für 1 Ampulle Test Thrombin 6 ml Aqua bidest.
Wir stellen jeweils eine der Fibrinogenlösung entsprechende Menge Thrombinlösung her.
Für 100 ml Thrombinlösung sind 17 Ampullen Test Thrombin und 5 Ampullen Ampuwa notwendig.
Die Thrombinlösung verarbeitet sich aber sparsamer als die Fibrinogenlösung, so daß man mit 15 Ampullen Thrombin und 90 ml Aqua bidest ohne weiteres auskommt.
Die Tränkung der trockenen fibrinogengetränkten Streifen ist durch die schlechte Benetzbarkeit etwas erschwert. Man kann sich aber dadurch helfen, daß man einen Glasstab in die Glasschale klemmt und nun die Streifen darunter durchzieht (Abb. 2).



- Abb. 2 -

Im Prinzip wird genauso verfahren wie bei der Fibrinogentränkung. Der Streifen wird nach der Thrombintränkung wieder über das Wasserbad gespannt und bei Zimmertemperatur getrocknet. Die trockenen Streifen werden dann in einem Exsiccator bei Zimmertemperatur aufbewahrt.
Zwischen Papierherstellung und -verwendung liegen mindestens 24 Stunden Aufbewahrung (28).
Das Fibrinpapier läßt sich auf diese Weise mindestens 1 Monat ohne Empfindlichkeitsverlust aufbewahren (28).
Prinzipiell zeigen sich bei der Anfärbung Unterschiede zwischen den einzelnen Streifen einer Serie bei jeweils gleichem Herstellungsmodus. Dies dürfte auf unterschiedliche Fibrinmengen im Papier zurückzuführen sein.

II. Testansatz:

Zantl (37) selbst schilderte einige Probleme der Spontanpapierfibrinolyse, die besonders den Ansatz betrafen. Er verwendete für den Inkubationsansatz Reagenzgläser. Die Folien mußten deshalb beim Einlegen gerollt werden und lagen der Reagenzglaswand an. Dadurch und durch die mechanische Beeinträchtigung der Folien beim Rollen - etwaige Falten oder Knicke färbten sich wegen der veränderten Papierkapillarität anders an - konnte die Anfärbung nie ganz einwandfrei werden.

Wir führten deshalb flache Schälchen ein (d = 5,2 mm). Die Ansatzmenge von 7 cm^3 behielten wir bei.
Bei unseren Versuchen traten aber unvorhergesehene Schwierigkeiten auf: In den Ansätzen zeigten sich schlierige, hauchdünne Gerinnsel. Sie waren jeweils nicht gleich deutlich sichtbar.
Je länger die Folien in der Plasmaverdünnung inkubiert wurden, umso stärker wurde die Gerinnselbildung. Nach 1 Stunde Inkubation sind die Gerinnsel nur bei genauem Hinsehen zu erkennen, nach 20 Stunden dagegen deutlich.
Die hauchdünnen Gerinnsel, die in der Flüssigkeit schweben, scheinen auf der ganzen Fläche des flach liegenden Papierchens aufzusitzen und gehen am Rand in die Flüssigkeit über. Oft hatten wir den Eindruck, als könnten wir die Gerinnsel von der Oberfläche ablösen. Wir versuchten die Frage zu klären, ob sich eine Gerinnselhaut auf die Folie auflegt oder aber sich von der Folie selbst ablöst.
Nach häufiger Beobachtung der Art dieser Gerinnselhaut nahmen wir an, daß eine Haut abgelöst würde.
Wir inkubierten Folien ohne Fibrinbelag. Hierbei zeigten sich niemals Gerinnselbildungen.
In weiteren Versuchen wurden Folien inkubiert, die einmal nur einen Fibrinogenbelag, das andere Mal nur einen Thrombinbelag hatten. Wir dachten daran, daß bei der Herstellung der Folien das Fibrinogen nicht vollständig durch das Test-Thrombin in Fibrin umgewandelt oder das Thrombin nicht vollständig verbraucht werden könnte. Aber auch bei diesen Versuchen konnten wir keine Gerinnselbildung nachweisen.
Lediglich die Ansätze, die mit Streptase aktiviert wurden, brachten brauchbare Ergebnisse; denn dabei traten nie Gerinnsel auf. Die Extinktionswerte waren einheitlich.
Durch die sonst auftretende Gerinnselbildung war die Brauchbarkeit der Methode sehr in Frage gestellt.
Wir veränderten darum die Methode Zantl der Spontanpapierfibrinolyse derart:

Ansatz:
6,5 ml Veronalpuffer
1 ml (0.5 ml) Zitratplasma (1:5) gewonnen bei 3500 rpm
Als Gefäß wurden flache Glasschalen verwendet.
h 1,5 cm; d 5,2 cm
Das Plasma soll gleichmäßig verteilt sein. Mit der Pinzette kurz umrühren!

1) Inkubation:

a) Die Folie wird mit der Pinzette (Objektträgerpinzette) flach auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegt. Sie saugt sich voll, bleibt aber schwimmend an der Oberfläche liegen.

b) Nun muß so lange gewartet werden, bis die Folie zu schwitzen beginnt, d.h. die Oberfläche wird glänzend feucht und zeigt eine einheitliche graue Farbe. Trockene, weiße Flecken dürfen nicht mehr vorhanden sein.

c) Durch Schütteln des Glasschälchens wird die Flüssigkeit über die noch oben schwimmende Folie gebracht, bis diese ganz bedeckt ist.

d) Nach ca. 1 Minute wird die nun nasse Folie in die Rähmchen gespannt und in der feuchten Kammer im Brutschrank aufbewahrt. 20 Stunden bei 37°C.
Die Folie wird dabei mit der Pinzette aus der Plasmaverdünnung geholt! An einer Ecke läßt man die Flüssigkeit abtropfen (abstreifen am Schälchenrand). Folie vorsichtig in das geöffnete Rähmchen legen. Sie darf nicht durchhängen! Rähmchen schließen.

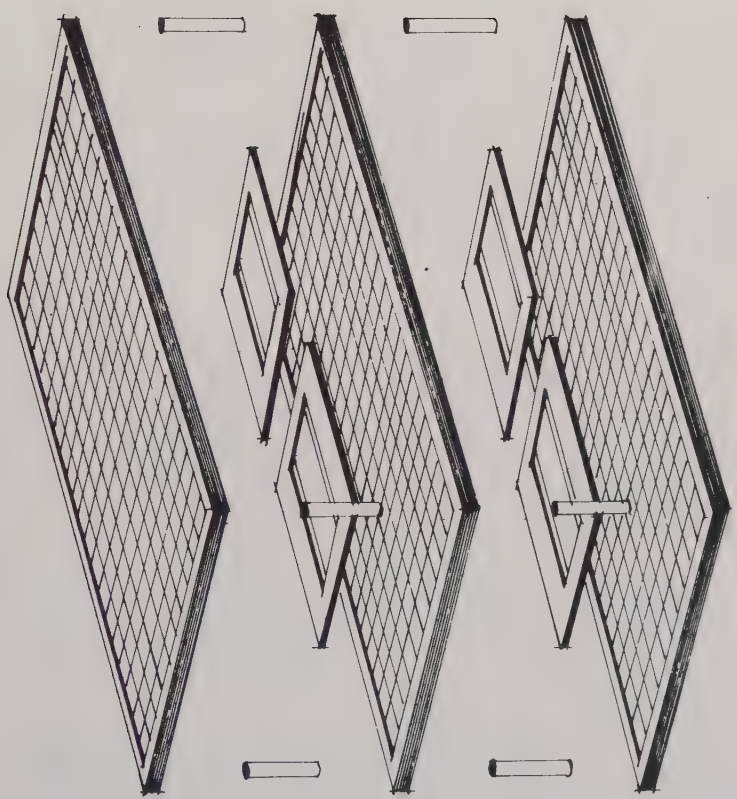
Rähmchen:
Plastik-Dia-Rahmen, die in jedem Fotogeschäft erhältlich sind, werden so verändert:
a) Schutzgläser herausdrücken
b) Rähmchen auf folgende Größe ausfeilen:
2,7 x 4,5 cm

Die Vorteile dieser neuen Arbeitsweise

1) schonende Behandlung der Folien bei der Inkubation
2) es treten keine Gerinnsel auf
3) die Extinktionswerte sind einheitlich; die Folien zeigen eine gleichmässige Anfärbung
4) eine große Anzahl von Folien kann platzsparend inkubiert werden (kleiner Brutschrank)
5) pro Ansatz ist nur 1 ml Plasma nötig. In jedem Ansatz können 6 Folien getränkt werden, ohne daß sich die Werte aus der ermittelten Fehlerbreite herausbewegen. Vorteilhaft bei Doppel- oder Mehrfachbestimmungen!
6) die Folie wird mit einer konstant definierten Menge getränkt. Es ist also kein Nachschub an lysewirksamen Stoffen möglich.

Feuchte Kammer:

Plastikbehälter mit gut abschließendem Deckel. Größe 10 x 18cm. In jedem Haushaltwarengeschäft erhältlich. Der Boden der "Feuchten Kammer" wird mit Zellstoff ausgelegt und mit ausreichend Aqua dest beschickt. Die Ablageflächen für die Folien werden so gelagert, daß sie nicht die Flüssigkeit der feuchten Kammer berühren. Wichtig ist, daß die Ablageflächen rostartig sind, damit sich die Feuchtigkeit überall gleichmässig halten kann. Als praktisch haben sich sogenannte Lüftungsgitter erwiesen, die ebenfalls aus Plastik sind. Man kann sie in der feuchten Kammer übereinanderbauen, ohne daß die Folien in den Rähmchen berührt werden. s.Abb. 2a
Inkubationszeit: 20 Stunden im Brutschrank bei 37°



2) Wässerung:

a) im fließenden Leitungswasser
Die Folien werden mit der Pinzette vorsichtig aus den Rähmchen genommen und in das Wasserbad gelegt. Hier sollen sie ca. 15 Minuten gewässert werden. Die Folien sind feucht leicht zerreißlich und müssen sorgfältig behandelt werden.

b) Bei den meisten Versuchen schloß sich an die 15 minütige Wässerung im fließenden Wasserbad eine 20 stündige Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung an:
Bechergläser wurden mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllt. Ansatzweise wurden die Folien darin gewässert. Die Bechergläser wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen.

III. Trocknen

Die Folien werden nach der Wässerung vorsichtig zum Trocknen gelegt. Wir verwendeten auch hier die Lüftungsgitter. Sie müssen mit etwas Zellstoff belegt werden. Darauf werden die Folien flach aufgelegt. Auch hier können die Roste übereinandergelegt werden. Beachten muß man jedoch, daß die aufgelagerten Roste nicht auf die darunterliegenden Folien drücken. Sonst würde das Rostmuster in die Folie eingepresst, was sich bei der Anfärbung negativ bemerkbar macht.
Man kann diese Gefahr leicht beseitigen, wenn man zwischen die Roste kleine Gummistöpsel legt und so den Abstand der einzelnen Roste vergrößert.

IV. Auswertung

a) Färbung (analog der Elektrophoresefärbung)
Die luftgetrockneten Fibrinpapierfolien werden in einem kleinen Wasserbad 15 Minuten mit Amidoschwarz 10 B (Bayer) gefärbt. Dabei werden sie einzeln in die Farblösung gegeben. Die Farblösung wird dann abgegossen und kann wieder verwendet werden.
Für die nun folgende Entfärbung verwenden wir Elphor-Entfärber. Die mit Amidoschwarz getränkten Folien werden mit

dem Entfärber übergossen und bleiben jeweils 10 Minuten liegen. Dieser Vorgang wird 9 mal wiederholt, jedesmal mit dem nächsten der neun Entfärber. Zuletzt muß der abgegossene Entfärber praktisch klar sein.
Der verwendete Entfärber enthält also eine in 9 Stufen abnehmende Konzentration an Amidoschwarz.
Man kann die einzelnen Entfärbermengen öfters verwenden. Zweckmässig ist es, den ersten Entfärber nach einiger Zeit zu erneuern. Es wird dann praktisch die Nr.1 zur Nr.9, die Nr.2 zur Nr.1 usw.
Während der Färbung und Entfärbung werden die Folien wiederholt mit einer Objektträgerpinzette gewendet. Außerdem wird der Färbebehälter dauernd geschwenkt.
Nach dem Entfärben werden die Folien bei Zimmertemperatur getrocknet. Dies dauert höchstens 1/2 Stunde.
Die trockenen Folien können danach photometrisch ausgewertet werden.

b) Photometrische Auswertung

Die getrockneten, gefärbten Folien werden zuerst im Vakuum (Wasserstrahlpumpe) mit einer Elphor-Transparenzflüssigkeit getränkt.
Die 6 Folien eines Streifens werden dann zwischen zwei dünne Glasplatten gelegt und so durch das Elektrophorese-Auswertungsgerät geschickt. (Elphor-Integraph, Bender & Hobein)
Die Extinktionswerte werden automatisch in Kurvenform auf eingelegtes Millimeterpapier gestanzt. An einem Zählwerk können die Planimeterwerte direkt abgelesen werden.
Von jeder Folie (3 cm breit) werden nur die inneren 2 cm ausgewertet. Der Rand unterliegt besonderer mechanischer Belastung und wird deshalb nicht berücksichtigt. Außerdem steht dadurch Platz für die Beschriftung der einzelnen Folien zur Verfügung.
Bei absoluter gleicher Anfärbung über die ganze Breite von 2 cm müßten die 20 eingestanzten Punkte (1 Punkt entspricht dem Extinktionswert einer Fläche von 0.1 x 3.9 cm) auf einer Geraden liegen. Meistens ist das aber nur angenähert der Fall.

Die Lysequote in Prozent kann nach folgender Formel er-

rechnet werden:

$$100 - \frac{(\text{Lysewert} - \text{Leerwert}) \times 100}{(\text{Fibrinwert} - \text{Leerwert})} = \text{Lysequote in \%}$$

Lysewert: Planimeterwert
Fibrinwert: 0 % Lysewert
Leerwert: Er gilt als 100%-Lyse-Bezugswert, da die Folie primär nicht mit Fibrin belegt wurde. Das einfache Elphor-Filterpapier wurde lediglich mit Amidoschwarz gefärbt und entfärbt.
Dabei läßt sich das Amidoschwarz nicht vollständig aus dem Leerpapier entfernen (15). Analog der Auswertung bei der Papierelektrophorese dient dieser Wert auch zur Einstellung einer Apparatkonstanten. Wir stellten diese Apparatkonstante mit Hilfe des Leerwertes nach jedem Streifen neu ein. Wenn der Eichleerwert unter Lichtabschluß in der Elphortransparenzflüssigkeit aufbewahrt wird, kann er längere Zeit benützt werden (bis zu 3-4 Monaten).

Abweichungen bei der Durchführung der Methode ohne Einfluß auf die Reproduzierbarkeit

1. Manche Folien saugen sich langsamer voll.
2. Manche Folien bleiben weniger gut feucht in der feuchten Kammer, ohne daß sich Unterschiede bei der Auswertung bemerkbar machten.
3. Bei geringerer Lyse scheint sich der Lysevorgang mehr auf die untere Seite der Folie zu konzentrieren. Bei der Anfärbung ist jedenfalls diese Seite heller als die andere. Da aber die Folien in transparentem Zustand ausgewertet werden (die beiden Seiten addieren sich gewissermaßen), spielt dies keine Rolle.
4. Manchmal ist der seitliche Randbereich der Folie heller

oder dunkler als die übrigen Flächen. Auch das beeinflusst die Auswertung nicht, da ja nur die mittleren 2 cm gemessen werden.

Bekannte Fehlerquellen

1. Bei der Streifenherstellung muß mit größter Genauigkeit gearbeitet werden. Der Streifen muß gleichmässig mit Fibrin belegt sein (keine Flecken stehenlassen). Auch wenn die nassen Streifen zwischentrocknen oder trocknen, muß darauf geachtet werden, daß sie nicht verunreinigt werden.
2. Wenn die Folien in die Rähmchen gespannt werden, müssen sie straff (eben) eingelegt werden. Sie dürfen beim Ablegen die Unterlagen (hier die Roste) nicht berühren.
3. Beim Wässern ist zu beachten, daß die feuchten Folien äußerst empfindlich sind. Sie können leicht einreißen und z.B. durch den zu starken Wasserstrahl geknickt oder zerknittert werden. So kann aber keine gleichmässige Anfärbung erreicht werden.
4. Die Folien dürfen beim Trocknen nicht gepreßt werden z.B. durch die aufliegenden Roste. Bei der Anfärbung ist dann dieses Rostmuster zu erkennen.
5. Beim Auswerten werden die transparenten Folien zwischen zwei Gläser gelegt. Es dürfen keine Luftblasen vorhanden sein. Folien <u>im</u> Transparenzöl einlegen und das überstehende Öl vorsichtig von den Gläsern abwischen!
6. Beim Auswerten darauf achten, daß wirklich die einwandfreien mittleren 2 cm gemessen werden, nicht Teile des Randbezirkes.
7. Manche Folien zeigen angefärbt große oder kleinere Flecken. Sie können für die Auswertung nicht verwendet werden. Wir nehmen an, daß die Ursache in der Streifenherstellung liegt, da man die Flecken schon an den vollgesaugten Folien feststellen kann. Diese Flecken wurden während unserer Arbeit nicht häufig beobachtet.

8. Bei einigen Folien hatte die etwas stärker angefärbte Randzone die 5 mm auf jeder Seite überschritten. Dadurch wird der Extinktionswert etwas höher. Bei einer gleichmässig angefärbten Folie vergrößert sich der Extinktionswert je 1 mm um den gleichen Betrag. Wenn man z.B. 1 cm auswertet und diesen Wert verdoppelt, erhält man einen Endwert, der sich vollkommen deckt mit dem Endwert der Folien, bei denen wie üblich die mittleren 2 cm ausgewertet wurden. Damit könnten auch diese Folien für die Auswertung verwendet werden.

Fehlergrenze - Standardabweichung

50 Extinktionswerte von 10 Streifen wurden statistisch ausgewertet.

Tabelle 1

Streifen		EW				M	
I	12.80	13.70	13.25	12.0	12.25	12.80	+ 0.90 - 0.80
II	11.85	11.60	11.30	12.0	11.60	11.67	+ 0.58 - 0.37
III	12.24	12.65	12.95	11.25	13.25	12.47	+ 0.78 - 1.22
IV	12.65	12.80	13.60	12.60	13.16	12.96	+ 0.64 - 0.36
V	12.55	12.40	12.30	13.50	13.25	12.80	+ 0.70 - 0.50
VI	12.25	13.25	12.65	12.25	12.95	12.63	+ 0.58 - 0.38
VII	13.05	13.20	12.70	13.05	12.05	12.81	+ 0.39 - 0.76
VIII	11.92	12.40	12.90	12.15	13.45	12.56	+ 0.89 - 0.64
IX	12.12	13.50	13.10	12.95	13.55	13.40	+ 0.10 - 1.28
X	14.15	13.20	12.35	13.0	13.18	13.17	+ 0.98 - 0.82
n = 50							
M						12,95	
s						0.69	

Zu Tabelle 1: Alle Folien wurden gleich behandelt

Ansatz: 1 ml Mischplasma

20 h Inkubation bei 37°C

15 Min. Wässerung im fließenden Leitungswasser

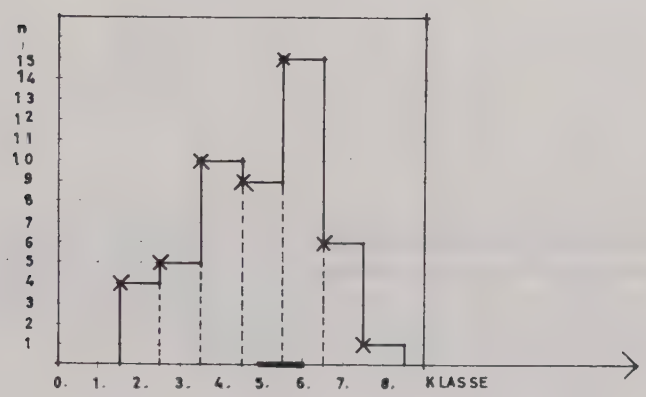
20 h Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung

Standardabweichung (mittl.quadrat.Abweichung) s = 0.69

Histogramm zu Tabelle 1

Die 50 Extinktionswerte (11.25 - 14.15) wurden in 7 gleiche Klassen geteilt.

Klassenbreite: 0,414



Der Mittelwert 12.95 liegt in der 5.Kolonne.

Informative Versuche mit der neuen Arbeitsweise

Mit dieser Versuchsreihe testeten wir die Brauchbarkeit der Methode bei verschiedener Anwendung:

1. - 6.	Plasma ohne Zusätze
7. - 9.	Plasma aktiviert mit Streptase
10. (a-f)	Versuche zur 0% Lysewertbestimmung
11. (A,B)	Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung

Unter den folgenden Versuchen sind noch einige Ansätze mit 0,5 ml Plasma. Wir gingen zu dem Ansatz mit 1 ml Plasma über, weil wir dann eine höhere Konzentration der Plasmaproteine erhalten. Da wir 6 Folien pro Ansatz tränken, hielten wir den 1 ml-Ansatz für geeigneter.

Plasma ohne Zusätze (1.-6.)

Die Ergebnisse dieser Versuche sollten zeigen, ob das normale Plasma oder Mischplasma eine meßbare Lysefähigkeit besitzt. s.Tab. 2

1) 6,5 ml Veronalpuffer
   0,5 ml Mischplasma a

Tabelle 2 Plasma ohne Zusätze

Ansatz	Folien						M
	1	2	3	4	5	6	
1) 6,5 ml VP 0,5 ml MPl a	16.27	17.15	17.43	16.84	16.35	16.62	16.77 + 0.66 - 0.50
2) 6,5 ml VP 1 ml MPl b	17.82	17.95	17.60				17.79 + 0.16 - 0.19
3) 6,5 ml VP 1 ml Pl (Pat.m. Sinnsthrombose)	14.42	14.70	15.00				14.70 + 0.30 - 0.28
4) 6,5 ml VP 1 ml MPl c	13.15	13.40	13.00	13.65	13.40	13.17	13.30 + 0.35 - 0.30
4)	13.55	13.60	13.90	14.25	14.17	14.70	14.30 + 0.40 - 0.75
5) 6,5 ml VP 1 ml MPl d	14.64	14.16	14.35	15.45	14.27	13.50	14.40 + 0.24 - 0.90
5)	17.18	16.75	17.20	17.35	17.10	17.15	17.12 + 0.23 - 0.37
5)	16.70	16.20	17.10	17.00			16.75 + 0.35 - 0.55
6) 6,5 ml VP 1 ml MPl e	14.55	14.00	14.93	15.65	15.00	15.65	14.96 + 0.69 - 0.96

Zu Tabelle 2: Nach diesen Ergebnissen hat das Mischplasma eine Lysequote von 19 % (EW 18) bis 52 % (EW 13). Auch am Einzelplasma konnten wir eine Lysequote bis 52 % messen. (17.79→18; 13.30→13)

Abkürzungen: EW = Extinktionswert Pl = Plasma
F = Folie Str = Streifen
MPl = Mischplasma VP = Veronalpuffer

Plasma aktiviert mit Streptase (7.-9.)

Durch die Aktivierung mit Streptase schafften wir uns als Modellversuch ein Plasma, wie es in der Praxis bei der Streptase-Behandlung eines akuten Gefäßverschlusses auftreten kann.
Von Interesse war, in welchen Lysebereich ein aktiviertes Plasma kommt und wie die hohe Lysequote mit der Methode registriert werden kann.

Tabelle 3

Ansatz	Str.	Folie			M	M d. nicht-akt.Pl
		1	2	3		
7) 6,5 ml VP 0,5 ml MPl a 100 E Streptase		2.24	2.26	2.35	$2.28^{+0.07}_{-0.04}$	$16.77^{+0.66}_{-0.55}$
8) 6,5 ml VP 1 ml MPl b 100 E Streptase		2.20	2.38		$2.29^{+0.09}_{-0.09}$	$17.79^{+0.16}_{-0.19}$
9) 6,5 ml VP 1 ml MPl 166 E Streptase	I	0.05	0.04	0.11	$0.06^{+0.05}_{-0.02}$	
9) 83 E Streptase	I	0.01	0.04	0.0	$0.02^{+0.02}_{-0.02}$	
9) 49 E Streptase	II	0.43	0.45	0.60	$0.49^{+0.11}_{-0.06}$	
9) 16,6 E Streptase	II	1.36 *	0.95	0.91		

Zu Tabelle 3: Mit der Methode läßt sich die Lyse bei aktiviertem Plasma gut messen.
Bei dem Versuch 9 wird mit der Aktivierung von 83 E Streptase schon eine Lyse von 100 % erreicht.
Eine meßbare Steigerung der Lysequote durch erhöhte Aktivierung ist in diesem Versuch nur bis 50 E Streptase-Aktivierung möglich.

*) Dieser Wert soll als Beispiel für eine fehlerhafte Bestimmung dienen.
Bei dieser Folie war die Randzone etwas stärker angefärbt und verbreitert. Beim Auswerten konnte man genau feststellen, wie der EW sprunghaft anstieg. Ansonsten wäre auch für diese Folie ein EW von 0.9 bis 1.0 gemessen worden.
vgl. S.20 (8)

10) Versuche zur 0%-Lysewertbestimmung

Ein großes Problem stellt der 0% Lysewert dar. Da wir mit der Spontanpapierfibrinolyse eigentlich ohne Zusätze arbeiten wollen, brauchen wir die beiden Bezugswerte, um die tatsächlich vorhandene Lyse messen zu können:

α) den 100 % Lysewert
β) den 0% Lysewert

Um eine Lyseänderung zu messen z.B. nach Aktivierung eines normalen Plasmas, reicht der Vergleich der Plasmen vor und nach der Aktivierung aus. Man mißt dann aber nur relative Prozente.

α) Sehr einfach kann man den 100 % Lysewert herstellen. Wir färbten nach Scholle das reine Elphorpapier mit Amidoschwarz. Eine Inkubierung dieses Leerwertes ist zwecklos, da die Plasmaproteine durch die Wässerung praktisch vollkommen ausgewaschen werden (Scholle).

β) Dagegen konnte das Problem des 0% Lysewertes bis jetzt nicht zur vollen Zufriedenheit gelöst werden. Das liegt daran, daß man das Fibrinpapier nicht einfach färben kann, ohne es inkubiert zu haben. Dann liegen die Extinktionswerte unter Umständen niedriger als bei inkubierten Folien, bei denen man eigentlich eine Lyse und damit niedrigere Werte erwartet hätte.
Scholle spricht hier von einer negativen Lyse (28).
Diese vermehrte Farbstoffaufnahme bei inkubierten Folien ist nur durch eine stabile Plasmaprotein-Adsorption an das Fibrinpapier trotz guter Wässerung zu erklären (28) - die Farbstoffaufnahme soll ja proportional dem Proteingehalt sein (15).

Wir färbten zwei nicht in Plasma inkubierte Fibrinpapierstreifen an und werteten sie aus.

F	Streifen A nicht inkubiert	F	Streifen B nicht inkubiert	F	Streifen C inkubiert
1	15.43	7	15.38	13	16.27
2	15.79	8	14.47	14	17.15
3	16.04	9	14.33	15	17.43
4	14.91	10	14.11	16	16.84
5	15.76	11	14.75	17	16.35
6	15.90	12	14.00	18	16.62

Die Werte liegen (zum Teil deutlich) niedriger als die Werte der Folien, die inkubiert waren.
Wir versuchten daraufhin, die Folien zu inkubieren, die Lyse aber durch Zusatz von eAcA zu stoppen.
Wir konnten jedoch mit der eAcA in einer großen Anzahl von Versuchen keinen eindeutigen Lysestop erreichen. Auch Scholle konnte bei Zugabe der eAcA zum Ansatz keine Lysehemmung feststellen.
Wir versuchten nun durch Verkürzung der Inkubationszeit und Weglassen der 20 stündigen Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung die Lyse herabzusetzen und damit die eAcA gleichsam zu unterstützen:

siehe Tabelle 4

Tabelle 4

Str.		Ansatz 6,5 ml VP +	Folien 1	2	3	M_A mit eAcA	M_B ohne eAcA
I	a	0,5 ml MPl a 10 mg eAcA	18.45	18.55	18.25	$18.42^{+0.13}_{-0.17}$	$16.77^{+0.66}_{-0.55}$
II	a	"	18.30	18.95	18.30	$18.52^{+0.43}_{-0.22}$	16.77
III	b	1 ml MPl b 10 mg eAcA	20.45	21.21	-	$20.83^{+0.38}_{-0.38}$	$17.79^{+0.16}_{-0.99}$
IV	c	1 ml MPl e 10 mg eAcA	21.80	20.30	21.36	$21.15^{+0.65}_{-0.85}$	$14.96^{+0.69}_{-0.96}$
V	d	1 ml MPl g 5 mg eAcA	21.30	21.30	20.83	$21.14^{+0.16}_{-0.31}$	16.18
VI	d	"	22.20	22.0	22.32	$22.17^{+0.15}_{-0.17}$	16.18
VII	d	"	21.63	20.60	20.12	$21.12^{+0.51}_{-1.00}$	16.18
VIII	e	1 ml MPl g 10 mg eAcA	20.9	19.92	20.07	$20.29^{+0.61}_{-0.37}$	16.18
IX	e	"	20.19	20.39	20.45	$20.34^{+0.11}_{-0.15}$	16.18
X	e	"	21.10	20.60	20.23	$20.64^{+0.46}_{-0.41}$	16.18

Zu Tabelle 4:

Folienbehandlung

M_A: Inkubation 1 Stunde; mit eAcA
Wässerung in fließendem Leitungswasser: 15 Min.

M_B: Inkubation 20 Stunden; ohne eAcA
Wässerung in fließendem Leitungswasser: 15 Min.
Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung: 20 Stunden

Wenn man die beiden Mittelwerte der Tabelle 4 miteinander vergleicht, könnte man annehmen, daß durch die eAcA ein Lysestop erreicht worden wäre.
Um aus diesen Werten aber Schlüsse ziehen zu können, muß die verschiedene Behandlung der Folien dieser beiden Reihen berücksichtigt werden:

1) die eine Reihe (M_A) wurde nur 1 Stunde inkubiert und lediglich im fließenden Wasserbad gewässert,

2) gegenüber der anderen Reihe (M_B), die 20 Stunden inkubiert, im fließenden Wasserbad und 20 Stunden in isotonischer Kochsalzlösung gewässert wurde.

Da ein Fibrinpapierstreifen 6 Folien ergibt, können mit einem Streifen nur 2 Fragen geklärt werden, wenn man Mittelwerte miteinander vergleichen will, die aus 3 Einzelbestimmungen errechnet wurden.
Die beiden anderen Fragen (Unterschied: 1 Std. Inkubation - 20 Std. Inkubation; Unterschied: in isotonischer NaCl-Lösung gewässert - nicht gewässert) haben wir in gesonderten Versuchsreihen beantwortet (s.Tab. 5 + 6).
Dabei ergab sich zwischen 1-stündiger und 20-stündiger Inkubationszeit ein EW-Unterschied von 3 und zwischen in isotonischer NaCl-Lösung gewässerten und nicht gewässerten Folien von 2.

Ergebnis

Wenn dieser Unterschied von 5 Extinktionswerteinheiten berücksichtigt wird, erkennt man, daß die höheren EW der Reihe M_A nicht durch einen Lysestop der eAcA erreicht wurden, sondern daß lediglich die Auswirkungen der 20-stündigen Inkubation und der 20-stündigen Wässerung in isotonischer NaCl-Lösung fehlten.

Schlüsse

Je nach Aktivität des Plasmas wird deshalb auch bei 1-stündiger Inkubation und Verzicht auf die Wässerung in isotonischer NaCl-Lösung die Höhe des EW schwanken. Ist die Lyseaktivität gering, wird ein hoher Extinktionswert von 20-22 gemessen werden, ist sie größer, ein tieferer EW von 17-18.

Der hohe EW 22 dürfte der maximal erreichbare sein, da wir nie höhere Werte messen konnten, und somit einem 0%-Lysewert entsprechen.

f) Die eAcA stoppte bei unseren Versuchen die Lyse nicht. Wir konnten das mit der folgenden Versuchsreihe bestätigen:

Tabelle 5

Str.	Folien 1	2	3	M 1 Std.ink.	Folien 4	5	6	M 20 Std.ink.	Δ
I	18.20	18.40	19.45	$18.70^{+0.75}_{-0.50}$	15.81	16.40	16.10	$16.10^{+0.30}_{-0.29}$	2.70
II	17.25	17.20	16.10	$16.85^{+0.50}_{-0.65}$	14.0	13.50	14.40	$13.70^{+0.70}_{-0.20}$	3.15
III	18.80	18.0	-	$18.40^{+0.40}_{-0.40}$	15.22	14.75	14.50	$14.82^{+0.40}_{-0.32}$	3.85

Zu Tabelle 5: Ansatz 6,5 ml VP
1 ml Pl
20 mg eAcA
15 Minuten im fließenden Wasserbad gewässert

Der Unterschied der Extinktionswerte bei einstündiger und zwanzigstündiger Inkubation ist signifikant. Die eAcA wurde sofort zum Ansatz zugegeben. Sie erzeugt keinen Lysestop.

Daß sogar schon in 1 Stunde trotz der eAcA-Zugabe eine Lyse stattgefunden hatte, konnte gleich nach der Färbung optisch nachgewiesen werden: Die eine Seite der Folie war sichtbar heller als die andere (S.19;3.)
Da wir bisher keinen 100%igen Lysestop mit eAcA erreichen konnten, verliefen die Ergebnisse der 0% Lyseversuche unbefriedigend. Die höchsten Extinktionswerte lagen zwischen 18 und 22, wobei als Erklärung nur die verschiedene Lyseaktivität der verwandten Plasmen angenommen wird. Bis ein besserer Weg zur 0% Lysewertbestimmung gefunden sein wird, haben wir als einheitlichen 0% Lysewert den Extinktionswert

22 eingeführt, weil höhere Werte nie bestimmt wurden und dieser Wert damit berechtigt erscheint.
Auch Scholle (28) hat bei seinen Versuchen festgestellt, daß die eAcA keinen Lysestop hervorruft, wenn sie direkt zum Inkubationsansatz zugegeben wird. Bis zu einer Konzentration von 20 mg eAcA/ml konnte kein Lysestop erzeugt werden (vergl. auch Deutsch (11)). Dagegen erreichte Scholle eine Lysehemmung, wenn er die Folien nach der Inkubation in isotonischer Kochsalzlösung wässerte, die eAcA in einer Konzentration von 10 mg/ml enthielt. Die Lyse war hier deutlich niedriger, als bei der Wässerung ohne eAcA. Mit dieser Versuchanordnung konnte er auch nachweisen, daß das adsorbierte Plasmin bei der Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung weiterwirkt. Nach Heimburger (16) soll die Salzlösung die Lyse sogar stimulieren.
Auch wir wollten mit unserer Methode prüfen, ob ein Unterschied zwischen gewässerten und nicht gewässerten Folien besteht:

11) Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung (A,B)

Die Wässerung über 20-22 Stunden wurde ursprünglich der Vorwässerung in fließendem Leitungswasser (15 Minuten) angeschlossen, da man annahm, durch die lange Wässerung könnte die völlige Herauslösung der adsorbierten Plasmaproteine erreicht werden.

Tabelle 6

Pl.	Str.	M_1 gewässert	M_2 nicht gewässert	Δ
1	A	16.36 + 0.64 - 0.91	18.73 + 0.62 - 0.63	2.27
1	B	15.70 + 0.45 - 0.40	18.26 + 0.32 - 0.61	2.56
2	C	13.18 + 0.22 - 0.18	14.60 + 0.75 - 0.95	1.42
2	D	13.40 + 0.25 - 0.23	14.0 + 0.10 - 0.05	0.60

Zu Tabelle 6: Ansatz 6,5 ml VP
1 ml MPl

Alle Folien wurden 15 Minuten vorgewässert. In isotonischer Kochsalzlösung wurde jeweils nur die Hälfte der Folien (M_1) eines Streifens gewässert.

M = Mittelwert aus 3 Einzelbestimmungen

M_1 und M_2 stammen aus einem Fibrinstreifen (um mögliche Qualitätsunterschiede zwischen den einzelnen Streifen zu vermeiden).

Ergebnis: Außer bei D besteht ein signifikanter Unterschied zwischen gewässerten und nicht gewässerten Folien.

Schlüsse: Während der Wässerung in isotonischer NaCl-Lösung scheint die Lyse fortgeführt zu werden.

Praktisches Arbeiten mit der Spontanpapierfibrinolyse

Wir haben bei 2 klinischen Fällen mit der Spontanpapierfibrinolyse die Lysequote bestimmt. Parallel wurde mit dem Thrombelastogramm gearbeitet.
Obwohl wir glauben, daß durch die Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung die Lysequote noch gesteigert wird, ließen wir die Methode unverändert. Wir verzichteten nicht auf die Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung!

1. Fall

Eine 55-jährige Patientin wurde wegen eines akuten Femoro-Poplitea Verschlusses in die Klinik eingeliefert.
Es wurde mit der Streptasebehandlung nach drei Tagen eine beidseitige Durchgängigkeit der Art. poplitea erreicht.
Man setzte die Behandlung mit Marcumar fort. Es traten aber daraufhin blutige Stühle auf. Der Quick-Wert sank auf 12%. Marcumar wurde abgesetzt. Die Folge war eine 2 Tage später eintretende Reobliteration.
Wegen des sehr hohen Antistreptokinasetiters versuchte man eine Rekanalisierung mit UROKINASE zu erreichen. Sie gelang.

Urokinase-Therapie

Tabelle 7

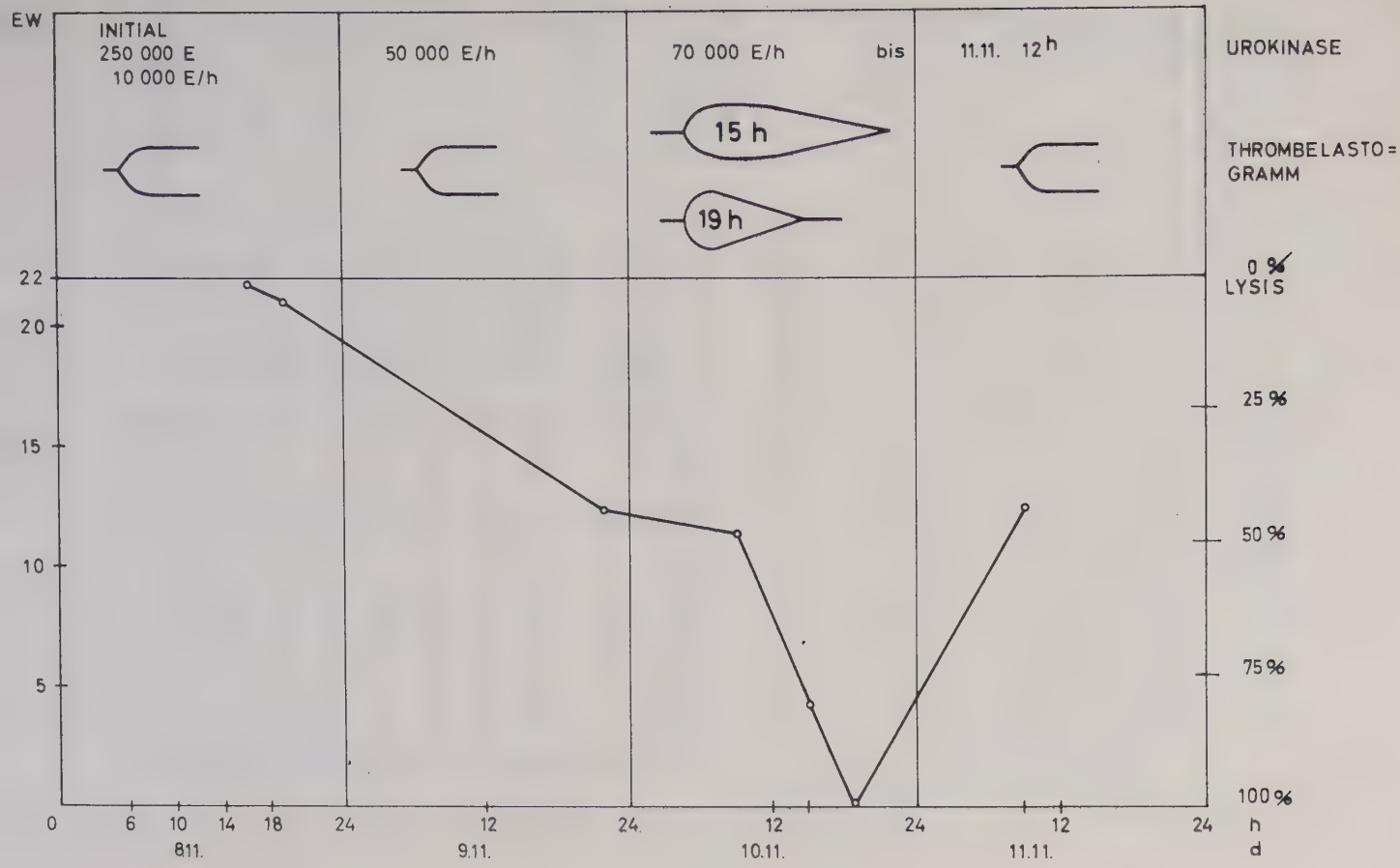
Abnahmezeit	M	Lysequote in %
Therapiebeginn 8.11. 16 Uhr	21.85 + 0.44 - 1.20	0
8.11. 19 Uhr	20.45 + 0.38 - 0.30	0
9.11. 22 Uhr	12.43 + 0.67 - 0.64	44
10.11. 9 Uhr	11.63 + 1.07 - 0.23	48
10.11. 15 Uhr	5.25 + 0.60 - 0.55	77
10.11. 19 Uhr	0.00	100
11.11. 9 Uhr	13.50 + 0.0 - 0.70	40

Zu Tabelle 7: M = Mittelwert aus mindestens 4 Einzelbestimmungen. Zur besseren Übersicht s.Abb.3

Ergebnis: Am 2. Tag der Urokinase-Therapie steigt die Lysequote auf 44 % an. Sie erreicht am 3. Tag 100 % und fällt am 4. Tag wieder auf 40 % ab.

Abb. 3

FIBRINOLYSESTEIGERUNG NACH UROKINASE-BEHANDLUNG



2. Fall

Der Patient kam mit einer obliterierenden Angiopathie beider Beine und des rechten Armes in die Klinik.
Oberschenkelarterien:
Schwere Arteriopathie mit Lumenschwankungen im Verlauf aller großen Beinarterien und ziemlich abrupte Obliteration der rechten Art.profunda femoris und Art.femoralis superficialis. Fehlen der linken Art.profunda femoris und Poplitea-Obliteration. Schwere endangiopathische Veränderung der Unterschenkelarterien. Die linke Art.tibialis anterior fehlt. Keine Kontrastfüllung im distalen Unterschenkel beidseits.
Die Thrombolyse mit Streptasebehandlung war so erfolgreich, daß das vorher in Ruhe schmerzhafte und kalte Bein wieder ausreichend durchblutet war und der Patient schmerzfrei kurze Strecken gehen konnte.

Streptase-Therapie

Tabelle 8

Abnahmezeit	M	Str.	Lysequote in %
28.11. 12^{30}	15.42 + 0.46 - 0.27	a	30
Therapiebeginn 28.11. 19^{30}	4.25 + 0.20 - 0.15	a	72
29.11. 8^{00}	1.31 + 0.39 - 0.41	b	96
29.11. 12^{00}	3.16 + 0.49 - 0.26	b	87
29.11. 15^{45}	4.53 + 0.39 - 0.28	c	70
29.11. 22^{00}	4.69 + 0.21 - 0.34	c	80
30.11. 10^{00}	4.91 + 0.24 - 0.28	d	79
30.11. 16^{00}	4.35 + 0.10 0.10	d	81
1.12. 10^{00}	4.90 + 0.30 - 0.40	e	79
1.12. 15^{00}	3.45 $\pm$ 0.05	e	85

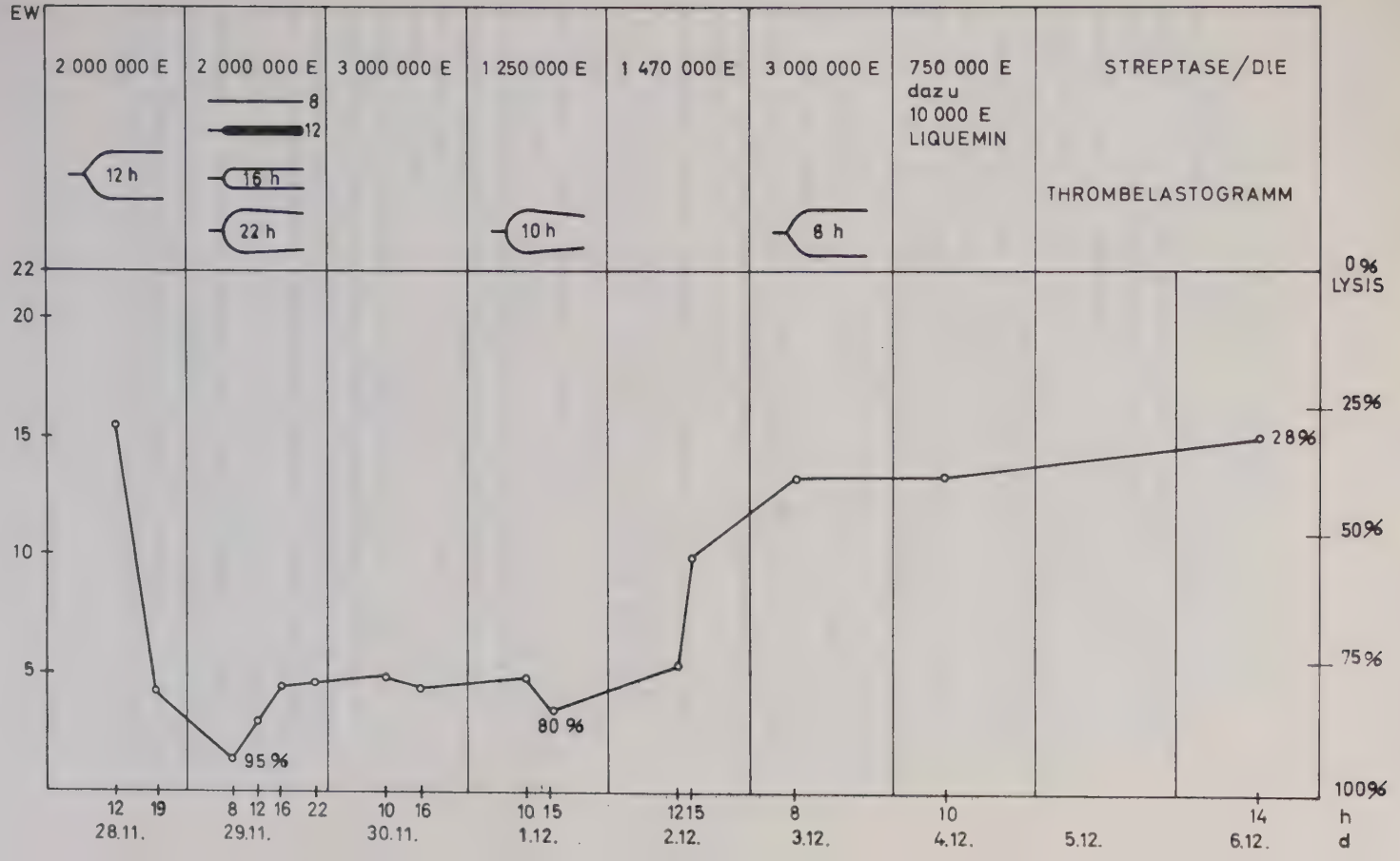
2.12. 11^{30}	5.60 + 0.55 - 0.45	f	75
2.12. 15^{00}	11.30 + 0.50 - 0.0	f	49
3.12. 8^{00}	13.30 + 0.15 - 0.25	g	40
4.12. 10^{00}	13.50 + 1.0 - 0.15	g	40
6.12. 14^{00}	15.17 + 0.33 - 0.32	h	31

Zu Tabelle 8: M = Mittelwert aus jeweils 3 Einzelbestimmungen. Zur besseren Übersicht s.Abb. 4

Ergebnis: Schon am Tag des Therapiebeginns stieg die Lysequote von 30 auf 72 %. Am 2.-5. Tag hielt sich die Lysequote in gleicher Höhe, um dann wieder in den nächsten Tagen auf den Ausgangswert zurückzukehren. Die Ergebnisse des Thrombelastogramms als Vergleichswerte stimmen gut überein.

Abb. 4

FIBRINOLYSESTEIGERUNG NACH STREPTASEBEHANDLUNG



D I S K U S S I O N

Die Papierfibrinolyse wurde von Goossens und Mitarbeitern (Müller (23)) an der Medizinischen Poliklinik inauguriert, von Scholle (28) modifiziert und von Zantl (37) zur Spontanpapierfibrinolyse umgeändert.

Einige Autoren (24,30,29) weisen darauf hin, daß die Verwendung von Rinderfibrinogen zum Nachweis fibrinolytischer Aktivität in menschlichen Plasmen wegen seines hohen Gehaltes an Plasminogen nur bedingt geeignet sei.
Nach Angaben der Herstellung des Rinderfibrinogens - Behring-Werke - soll der Plasminogengehalt des Fibrinogens sehr gering sein.

Wir modifizierten den von Zantl (37) verwendeten Ansatz und die Art der Inkubation.
Zantls Ansatz enthielt 6,5 ml Veronalpuffer und 0,5 ml Zitratplasma (1:5). Die Folien wurden gerollt in Reagenzgläsern inkubiert.
Unser Ansatz enthält dagegen 1 ml Plasma und die Folien werden in Rähmchen gespannt und in der feuchten Kammer inkubiert.
So ersparten wir Material und konnten die Folien schonender behandeln, was sich in einer gleichmäßigen Anfärbung und einheitlichen Extinktionswerten zeigte.
Ein besonderes Problem stellte die Ermittlung des sogenannten 0%-Lysewertes dar. Diese Frage konnten wir nicht zufriedenstellend lösen. Mit der Epsilon-Amino-Kapronsäure konnten wir keinen Lysestop erreichen, wenn wir die eAcA sofort zum Ansatz dazugaben.
Scholle (28) bestätigte diese Ergebnisse, konnte aber die Lyse stoppen, wenn er zur isotonischen Kochsalzlösung bei der Wässerung eAcA zugab. So konnte er eine Fortführung der Lyse während der Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung verhindern.

Wenn man die Fibrinfolien sofort färbt, ohne sie in Plasma zu inkubieren, müßte man theoretisch einen 0%-Lysewert erhalten, da die Folie keiner Lyse ausgesetzt wird. Die Extinktionswerte der so behandelten Folien sind jedoch oft niedriger als die Werte inkubierter Folien, bei denen man eine Lyse erwartet hätte.

Diese sogenannten negativen Ergebnisse (Scholle) lassen sich dadurch erklären, daß durch eine stabile Plasma-Protein-Adsorption an das Fibrinpapier eine vermehrte Farbstoffaufnahme erfolgt. Die Farbstoffaufnahme soll proportional dem Proteingehalt sein (15).

Ein weiteres Problem stellte die Wässerung der Fibrinpapiere nach der Inkubation dar. Die Vorwässerung (15 Minuten) in fließendem Leitungswasser soll nur mechanisch den oberflächlichen Film von Plasmaproteinen entfernen. Die anschließende Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung über 20-22 Stunden ist dagegen auf die Lyse nicht ohne Einfluß. Der Unterschied des Extinktionswertes zwischen in isotonischer Kochsalzlösung gewässerten und nicht gewässerten Folien ist signifikant. Nach Heimburger (16) wird die Lyse durch salzhaltige Lösungen sogar stimuliert.

Die Versuche unserer Arbeit sollten die Brauchbarkeit der Spontanpapierfibrinolyse für wissenschaftliche und klinische Belange prüfen. Wir konnten den Arbeitsgang vereinfachen. Dadurch, daß pro Ansatz sechs Folien getränkt werden können, ist ein sparsames Arbeiten möglich. Auch die Verwendung der Plastikrähmchen hat die Arbeit mit dieser Methode vereinfacht.
Für diagnostische, klinische Arbeiten, die schnelle Ergebnisse verlangen, ist die Methode allerdings noch nicht zu gebrauchen, da der Zeitaufwand für Inkubation und Wässerung zu groß ist.
Die Inkubationszeit von zwanzig Stunden müßte auf 1-2 Stunden herabgesetzt werden. Vielleicht könnte man durch eine große Anzahl von Versuchen den Unterschied zwischen 1-20stündiger Inkubation feststellen und diesen Wert bei der Beurteilung des Einstundenwertes berücksichtigen (vergl.Tab.4).
Die Inkubationszeit auf die Hälfte zu verkürzen, ist praktisch kaum durchführbar, da das Ergebnis erst in ungünstigen Tages- oder Nachtzeiten vorläge.
Auf die 20-stündige Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung könnte verzichtet werden. Die Ergebnisse würden dann aber einen etwas geringeren Lysewert aufweisen, d.h., die Sensitivität der Methode würde verringert. Nachdem die eAcA bei

unseren Versuchen die Lyse nicht stoppte, ließe sich die Lyse vielleicht mit Trasylol oder einer Mischung aus Trasylol und eAcA brauchbar hemmen, so daß auch der Null-Prozent-Lysewert noch eindeutig geklärt werden könnte. Vorerst ist die Methode in der von uns entwickelten Modifikation gut geeignet, die fibrinolytische Aktivität einer Testflüssigkeit quantitativ zu messen, wofür wir den praktischen Nachweis bei der Verfolgung der Lyseaktivität während der Streptase- und Urokinase-Verwendung erbringen konnten.

Zusammenfassung

1) Die Methode zur Bestimmung der Spontanpapierfibrinolyse wurde auf Fehlerquellen untersucht und auf Grund der Beobachtungen modifiziert.

2) Durch Änderung des Inkubationsansatzes und verschiedener Arbeitsgänge bei der Durchführung der Methode konnte eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Richtigkeit der Ergebnisse erreicht werden.

3) Die Standardabweichung für die Extinktionswerte der einzelnen Folien beträgt s = 0,69.

4) Pro Ansatz können 6 Folien getränkt werden.

5) An Plasmen normaler Versuchspersonen wurden Lyseaktivitätsunterschiede zwischen 19 und 52 % gefunden.

6) Zugabe von e Aminokapronsäure zum Ansatz während der Inkubation stoppt die Lyseaktivität nicht, weswegen sie zur Darstellung eines 0%-Lysewertes ungeeignet ist. Auf Grund unserer Untersuchungen nehmen wir daher den höchsten je gemessenen EW von 22 als sogenannten 0%-Lysewert. Er wird durchgehend angewandt zur Errechnung der absoluten Lysequote.

7) Beim Vergleich zweier Plasmen - etwa vor und nach einer Therapie - ist der 0%-Lysewert nicht notwendig.

8) Wir nehmen an, daß während der Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung die Lyse weiterläuft und nicht nur Plasmaproteine herausgelöst werden.

9) Mit der Spontanpapierfibrinolyse konnten wir an klinischen Fällen sowohl bei Streptokinase- als auch Urokinasetherapie die erfolgte Lyse quantitativ nachweisen und verfolgen, wobei sich keine durchgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Thrombelastogramms gezeigt haben.

Literaturangaben

A: 1) Albondi, F.B. und de Renzo, F.S.
Mechanism of clot lysis by streptokinase and effects of epsilon-Aminocaproic Acid. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 102; 717 (1959)

2) Albrechtson, O.K.:
Brit.J.Haemat, 3, 284 (1957)

3) Astrup, T., und Permin, P.M.:
Nature (Lond.) 159, 681 (1947)

4) Astrup, T.:
The biological significance of fibrino-Lysis.
Lancet: 1956/II : 565

B: 5) Back, N.; Ambrus, J.L. Simpson, C.L. und Shulman, S.:
Study on the effect of Streptokinase activated Plasmin on clots in various stages of organisation.
J.clin.Invest.: 37: 864 (1958)

6) Back, N.; Ambrus, J.L. und Markus, G.:
Fate of J 131-labeled components of the fibrinolysis system.
Fed.Proc. 18: 364 (1959)

7) Beller und Glas, P.:
Inhibition of clotting as the result of Plasminogen activation by Streptokinase:
II: Analytical studies of the clotting mechanism.
Thromb.Diath.Haemorrhagic.
Vol.V, No. 3/4: 520 (1960)

8) Bjorkman, S.E., Laurell, C.B., und Nilson, I.M.:
Scand.J.clin. Lab.Invest. 8, 304 (1956)

D: 9) Dastre, A.:
Arch.Physiol.norm.path. 25, 601 (1893)

10) Davies, M.C. und Englert, M.E.:
Physical properties of highly purified human Plasminogen.
J.biol.Chem.: Vol. 235, No. 4: 1011 (1960)

11) Deutsch:
Fortschritte der fibrinolytischen Therapie,
Blut, Band VII:472 (1961)

F: 12) Fantl, P., und Simon, S.E.:
Aust. J. exp. Biol. med. Sei. 26, 521 (1958)

13) Fonio, A.:
Über die Kontrolle der Wirkung fibrinolytischer
Präparate.
Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. VI, No. 2/3 : 339 (1961)

G: 14) Goodpasture, E.W.:
Bull. Johns Hopk. Hosp. 25, 330 (1914)

15) Graßmann, W. und Hannig, K.:
Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der
Serumproteine durch Papierelektrophorese.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 290 : 1 (1952)

H: 16) Heimburger:
Sonderdruck Behring-Werke, Mitteilungen Heft 41,
Seite 84-102 (1962)

17) Hunter, J.:
Works of, edited by J.P. Palmer, Bd. 1 (1835)

J: 18) J.clin.Invest, 38, 1086 (1959)

K: 19) Koller, F.:
Fibrinolyse, Schweiz.med.Wschr. 44 : 1233 (1960)

M: 20) Macfarlane, R.G., und Biggs, R.:
Lancet 1946/II, 862

21) Morgagni, J.P.:
De sedibus et causis morborum, per anatomen
indagatis. Tomus sec. 1761.

22) Müller, K.H.:
Erste Erfolge mit hochgereinigter Streptokinase zur Thrombolyse in der Chirurgie.
Bruns Beitr. klin. Chir. 202 : 3 (1961)

23) Müller, R.:
Fibrinolyse und arterielle Obliteration.
med. Diss. (München 1962)

24) Müllertz, S. und Lassen, M.:
An activator system in blood indispensable for formation of Plasmin by Streptokinase.
Proc. Soc. exp. Biol. Med.: 82 : 291 (1953)

N: 25) Nilsson, I.M., Skanse, B., und Gydell, K.:
Acta med. scand. 159, 463 (1957)

P: 26) Phillips, L.L. und Skrodelis, V.:
The fibrinolytic enzym system in normal, haemorrhagic and disease states.
J.clin.Invest. 37 : 965 (1958)

R: 27) Ratnoff, O.D., Pritchard, A., und Colopy, J.A.:
New Engl.J.Med. 253, 63 (1955)

S: 28) Scholle, E.
med.Diss. (München 1964)

29) Sherry, S,, Fletcher, A.P., und Alkjaersig, N.:
Physiol. Rev. 39, 343 (1959)

30) Sherry, S.
The fibrinolytic activity of Streptokinase activated human Plasmin.
J.clin.Invest. 33 : 1054 (1954)

31) Soulier, J.P., Mathey, J., Le Bolloch, A.G., Daumet, P., und Fayet, H.:
Rev. Hèmat. 7, 30 (1952)

32) Stamm, H.:
Einführung in die Klinik der Fibrinolyse
Verlag S.Karger, Basel 1962

33) Stefanini, M., und Dameshek, W.:
The haemorrhagic Disorders. Grune & Stratton, New York 1955.

T: 34) Tagnon, H.J., Whitmore, W.F., Schulman, P., und Kravitz, S.C.:
Cancer 6, 63 (1953)

35) Tillet, W.S., und Garner, R.L.:
J.exp.Med. 58, 485 (1933)

W: 36) Weiner, A.E., Reid, D.E., und Roby, C.C.:
Amer.J.Obstet.Gynec. 66, 465 (1953)

Z: 37) Zantl
Fibrinolysebestimmungsmethoden, Fibrinolyse-aktivierung durch Heparin und Nikotinsäure.
med.Diss. München 1966

Lebenslauf

Ich, Ernst Jörg Sipos, wurde am 2.5.1940 als erstes von drei Kindern des Architekten Soltan Sipos und seiner Ehefrau Gertraude, geborene Engel, in Dresden geboren.
Ab 1946 besuchte ich in Schwabach die Volksschule, ab 1951 das Humanistische Gymnasium Schwabach, wo ich 1961 meine Reifeprüfung ablegte.
Das Medizinstudium begann ich an der Philipps-Universität in Marburg im WS 1961/62. Nach dem Physikum im WS 1964/65 setzte ich mein Studium in den klinischen Fächern in München fort.
Ich beabsichtige, 1967 mein Medizinisches Staatsexamen abzulegen.

Bamberger Fotodruck · Rudolf Rodenbusch